

人破骨细胞的原代培养和生物学特性

马伟光 周树夏 刘宝林 张 郁 吴军正

(第四军医大学口腔医学院 西安, 710032)

维持骨体积是骨吸收与骨形成相对平衡的结果, 如失去这种稳定, 则发生病理性变化, 骨吸收破坏是主要现象之一, 但关于骨吸收机理还不清楚。近些年来随着骨细胞培养技术的发展, 使人们对骨吸收有了进一步认识, 目前公认破骨细胞是骨吸收作用的主要承担者。为此, 大多数学者从破骨细胞入手, 对破骨细胞的结构和功能等进行研究。目前已从多种动物骨组织中分离出破骨细胞^[1-3]。本实验是通过建立人的破骨细胞分离、培养方法, 为进一步开展骨吸收机理的研究奠定基础。

材 料 与 方 法

一、破骨细胞的分离

6个月的引产胎儿, 消毒后取股骨、胫骨、肱骨, 置入无血清199培养液玻璃培养皿中。将附着的软组织、骨膜以及干骺端的软骨部分去净。留下的骨干部分用199培养液清洗干净, 再置入DMEM培养液中(含有25 mmol/L HEPES缓冲液, 10%灭活胎牛血清, 100 μ/ml青霉素, 100 μ/ml链霉素), 纵向将骨干剖开, 用手术刀搔刮骨髓腔, 然后, 用吸管吸取培养液反复冲洗骨片, 使附着于骨片上的细胞冲入培养液中。静置30秒钟, 使碎骨片沉降, 吸取细胞悬液, 1000 r/min离心10分钟, 弃去上清液, 再加入4 ml DMEM培养液, 制成细胞悬液备用。用0.02%台盼蓝染色, 活细胞率达95%以上。

二、骨片的制备

取健康人股骨的皮质骨(因创伤致死), 去净软组织和骨膜。沿骨纵轴用低速骨锯, 在冷水降温下切割成0.6×0.6 cm、厚约0.1 cm骨片, 金刚砂轮磨成10 μ厚的薄骨片。用打孔器制成直径0.5 cm的圆形骨片, 再用手术刀在其表面划上1 mm的方格。置入灭菌蒸馏水中, 用超声波清洗器清洗30分钟, 换液三

次。然后浸泡于含有1000 μ/ml青霉素、500 μ/ml链霉素、达克宁浓度为5%的199培养液中, -20℃保存、备用。

三、破骨细胞的培养

将骨片置入孔径16 mm的培养板中, 每孔加1 ml破骨细胞悬液。置培养箱中, 在5%CO₂、37℃、饱和湿度条件下, 培养30分钟。取出骨片, 在DME M培养液中荡洗, 以洗掉未贴附于骨片上的细胞。然后, 更换培养板, 每孔再加入1 ml DMEM培养液(含25 mmol/L HEPES缓冲液、10%灭活胎牛血清、100 μ/ml青霉素、100 μ/ml链霉素), 继续培养。

另取4个灭菌的玻璃培养皿(容量5 ml), 放入玻片, 滴加破骨细胞悬液0.5 ml, 孵育2小时后, 再加DMEM培养液1.5 ml, 放入孵育箱中培养24小时。

鉴定方法与结果

一、倒置光相差显微镜观察

1. 破骨细胞形态学观察: 破骨细胞培养24小时后, 附着于盖玻片上, 可见散在的胞体大、外形不规则, 胞浆有多个伪足样突起, 37℃恒温下, 固定视野, 定时观察, 可见细胞外形不断变化。从其细胞体积及外形与其它类型细胞有明显区别。

2. 噬骨观察

当破骨细胞与骨片共同培养24小时后, 骨片上出现骨吸收陷窝, 开始时多为圆形, 随着培养时间的延长, 骨吸收陷窝逐渐扩大, 呈多环形、沟状或不规则形, 由于骨吸收陷窝受折射线的影响, 在镜下往往比正常骨区更明亮。

二、HE染色

破骨细胞体积大, 含有3—10个细胞核不等, 细胞核呈圆形或椭圆形, 每个核有1—3

个核仁。

三、甲苯胺蓝染色

样品用1%戊二醛固定10分钟,蒸馏水冲洗,再置入0.1%甲苯胺蓝液中10秒钟,冲洗,甘油封片,光镜下观察,可见核染为深蓝色的多核细胞,核呈圆形,大小均匀呈环状排列,胞浆中有大小不等的空泡。

四、酸性磷酸酶反应

采用Gomori的方法。结果显示胞核不着色,胞浆存在浓密的棕黑色颗粒,分布均匀,愈接近核周的胞浆着色愈浓密呈波环形,为酸性磷酸酶阳性反应。作为对照的纤维样细胞等,胞浆仅有极少量的浅棕色颗粒或几乎不着色,为阳性反应(图版图1)。

五、扫描电子显微镜观察

破骨细胞与骨片共同培养一周时,将骨片取出。A组4个骨片用0.1%Triton X-100处理30分钟,消化骨片上附着生长的细胞。B组不经消化细胞处理。然后,将上述两组骨片用3%戊二醛4℃下固定2小时,0.1 mol/L PBS冲洗,1%锇酸后固定2小时,逐级乙醇脱水各5分钟,乙晴置换后,真空干燥,喷镀白金。日立S-520型扫描电镜下观察,加速电压20 kV。

电镜下所见,B组,破骨细胞附着于骨片表面,粗大的胞突尖端下方骨面有不规则的骨吸收区,呈虫蚀状,骨胶原暴露(图版,图2)。A组,光滑的骨面上散在有多个圆形、多环形、犁地状等形态不同、大小不等的骨吸收陷窝(图版图3)。这些骨吸收陷窝与正常骨结构的哈佛氏系统以及骨细胞陷窝有明显区别。骨吸收陷窝底为粗糙的骨胶原,而正常窝、管状骨结构均为钙化一致的光滑表面。

讨 论

自从Chambers等[4]建立破骨细胞的分离、培养技术以来,目前已从多种实验动物体内分离出破骨细胞,其分离方法亦有不断的改

进。本实验是综合Chambers^[4]和Boyde^[5]的方法。经过多次摸索,首次从胎儿的长骨中分离出破骨细胞,进行培养。为人的破骨细胞功能的体外研究,奠定了基础。

目前多数学者认为:破骨细胞来源于骨骼外的生血系统,其前驱细胞属造血干细胞的初始单核细胞,而这些单核细胞融合成破骨细胞。因而,破骨细胞胞体大,多个核,一个破骨细胞所含的细胞核数可多达数十个^[6,7]。

破骨细胞胞浆中含有丰富的酸性磷酸酶,是其主要特征之一。因此,酸性磷酸酶染色被做为鉴定破骨细胞的主要手段。破骨细胞还含有丰富的抗酒石酸磷酸酶(Tartrate Resistant Acid Phosphatase, TRAP),它是酸性磷酸酶的一种同功酶,而且更具有特异性。此外,破骨细胞中还含有溶酶体酶,芳香基硫酸脂酶(Drylsulfatase)、组织蛋白酶(Cathepsin)、 β -葡萄糖醛酸酶(β -Glucuronidase)和 β -甘油磷酸脂酶(β -Glycerophosphatase),标定位实验证明,这些酶存在于粗面内质网和高尔基氏体中。一旦破骨细胞形成封闭的骨吸收间隙,则分泌多种溶酶体和离子造成局部的酸环境,使矿物质酸蚀溶解,暴露出骨基质,胶原纤维又经酶作用,使之分解,发生骨吸收^[4,8]。

破骨细胞的噬骨功能是其独有的特性,通过观察到的骨吸收陷窝,可以证明,破骨细胞具有吸收骨盐、骨胶原、骨基质等所有骨的组成成分的能力。而其他细胞则没有这种能力,这是鉴别破骨细胞最客观的方法。在实验中还发现,破骨细胞的骨吸收与移行是独立的过程,成排行多个圆形或卵圆形的骨吸收陷窝之间以及破骨细胞与骨吸收陷窝之间互不连续。这种现象提示,破骨细胞的骨吸收活动主要发生在细胞移行过程中的间歇期,而移行时骨吸收作用较弱。这种现象与相差显微镜下12小时定时观察,破骨细胞的伪足活动时而静止、时而运动的行为相符合,说明破骨细胞的噬骨活动是间歇性的,而且并不是所有贴附着于骨面上的破骨细胞在培养中都发生骨吸收作用。

由此看来,破骨细胞的功能活动是复杂的,还受着全身和局部因素的影响,而且与其他细胞如成骨细胞等存在着相互作用^[9],这些均需做进一步的研究。

通过分离、培养人破骨细胞的实验,我们体会人破骨细胞培养成活较动物更难,对培养条件要求高,我们认为 DMEM 培养液, pH 7.0 更利于破骨细胞生长。将其与骨片共同培养,出现骨吸收比兔破骨细胞晚 2—3 天。原因之一可能是从取材到培养经时比较长,破骨细胞的活性受到影响,如将分离的人破骨细胞先培养 3 天,再做噬骨实验效果更好。在本实验中,培养了 17 天的人破骨细胞仍有骨吸收功能。说明此方法分离培养的人破骨细胞,可供骨吸收机理的体外研究。

参 考 文 献

- [1] Turksen, K. et al., 1988, *J Bone Miner Res.*, 3(4): 389—396.
- [2] Anderson, R. E. et al., 1986, *Calc Tiss Int.*, 39(4): 252—261.
- [3] Miller, S. C. et al., 1984, *Anat Rec.*, 208(2): 223—232.
- [4] Chambers, T. J. et al., 1982, *J Pathol.*, 136: 27—34.
- [5] Boyde, A. and Jones, S. T., 1984, *Br Dent J.*, 156: 216—224.
- [6] Marks, S. C., 1983, *J Pathol.*, 12: 226—237.
- [7] Patricia, J. F. et al., 1980, *Nature.*, 283(14): 669—681.
- [8] Takeyoshi, Y. et al., 1990, *J Cell Phys.*, 145: 587—598.
- [9] Raisz, Z. G. et al., 1990, *Calc Tiss Int.*, 46: 233—241.

涎腺腺样囊性癌多种癌基因 mRNA 的表达

赵文川* 章魁华 马大权 王洪君 马大龙**
(北京医科大学口腔医学院 100081)

Barbacid 等从人膀胱癌细胞株成功地克隆分离出 C-ha-ras 癌基因的开创性工作使分子生物学和遗传工程学技术开始应用于人类肿瘤研究^[1]。细胞癌基因激活和异常表达的研究加深了对细胞癌变的根本原因的认识。有关人癌基因异常表达的报道日渐增多,人们企望从中发现人癌基因异常表达的规律,以指导肿瘤的预防、诊断和治疗。涎腺腺样囊性癌(Salivary adenoid cystic carcinoma, SACC)是一种严重危害人类健康的恶性肿瘤,虽生长缓慢,但有较强的浸润性和转移力。为了揭示其特殊生物学行为的来源,我们选择了已有文献报道的与肿瘤浸润、生长和转移表型有关的癌基因 H-ras、K-ras、V-erbB 1、C-myc、V-sis 进行了 SACC 细胞、口腔鳞癌细胞和胃腺癌细胞的

原位杂交。

· 材 料 与 方 法

癌细胞取自本院外科实验室 1983 年从小涎腺 SACC 和舌鳞癌组织选育的 SACC-83、TC-83 细胞株(分别为 109 代和 98 代)及北京肿瘤研究所王乃勤研究员惠赠的胃腺癌细胞株 MGC 803。癌基因 H-ras、K-ras、V-erbB 1、C-myc、V-sis DNA 探针购于华美公司,碱性磷酸酶原位杂交显示盒和过氧化物酶显示盒分别购于 Gibco 公司和 Vector 公司,Levamisol 由桂林制药厂惠赠,其他均为核酸研究和一般试验室试剂。

1. 细胞片制备 将对数生长期癌细胞消化并轻吹打成的细胞悬液接种于放有盖片的六孔板或宽口培养

* 现在天津市肿瘤医院工作,邮编 300060。

** 北京医科大学免疫学教研室。